

DISTINÇÃO DE FENÓMENOS DE *BULKING* EM LAMAS ACTIVADAS POR TÉCNICAS DE ANÁLISE DE IMAGEM

António L. AMARAL¹; Daniela P. MESQUITA²; Eugénio C. FERREIRA³

RESUMO

No corrente trabalho estudou-se a capacidade de uma metodologia de processamento e análise de imagens para detectar diferentes tipos de perturbações que podem afectar um sistema de lamas activadas. Para o efeito, foram realizadas experiências numa instalação laboratorial de lamas activadas de forma a se obterem condições de *bulking* filamentoso, *bulking* zoogléico e crescimento de flocos *pin point*, para além de condições normais de funcionamento. Foram recolhidas amostras no decurso de cada experiência e determinados diversos parâmetros operacionais incluindo os sólidos suspensos totais (SST) e índice volumétrico de lamas (IVL). Ao nível dos parâmetros morfológicos, obtidos pela metodologia de análise de imagens, foram analisados o conteúdo e morfologia da biomassa agregada e o conteúdo em bactérias filamentosas. Os resultados obtidos permitiram o esclarecimento das diferentes inter-relações presentes entre cada uma das condições estudadas e os parâmetros que caracterizaram a biomassa microbiana. Mais, foi ainda possível determinar as condições em que é possível a aferição dos parâmetros operacionais IVL e SST, a partir da caracterização da biomassa.

Palavras-chave: Análise de imagem; *Bulking*; Lamas activadas

¹ Doutoramento, Professor Adjunto, Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, Rua Pedro Nunes, Quinta da Nora, 3030-199 Coimbra, Portugal, lpamaral@isec.pt, Tel: (+351) 239 790 200

Investigador doutorado, IBB – Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal

² Mestrado, Doutoranda, IBB – Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal, daniela@deb.uminho.pt, Tel: (+351) 253 604 400

³ Agregação, Professor Associado com Agregação, IBB – Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal, ecferreira@deb.uminho.pt, Tel: (+351) 253 604 407

1 INTRODUÇÃO

O sistema de lamas activadas é o processo biológico mais usado no tratamento de águas residuais. Este sistema consiste num tanque de arejamento onde ocorre a fase bioquímica e num sedimentador onde ocorre a fase física. A fase física de separação sólida-líquida é uma das operações mais críticas em processos de lamas activadas. Esta fase apresenta três funções: espessamento (recirculação das lamas para o tanque de arejamento); clarificação do efluente; e armazenamento de lamas. A sedimentabilidade das lamas é usualmente dependente da estrutura, densidade e tamanho dos agregados microbianos, podendo estas propriedades sofrer súbitas alterações devido a variações ou perturbações das condições nas estações de tratamento de águas residuais (Wilén *et al.*, 1999). No entanto, é também necessário um equilíbrio entre bactérias filamentosas e bactérias formadoras de flocos para manter uma boa sedimentabilidade das lamas (Jenkins *et al.*, 2003). De acordo com Bitton (1994) as perturbações nos sistemas de lamas activadas podem ser de diferentes tipos: flocos *pin point* pela ausência de bactérias filamentosas, apresentando baixa sedimentabilidade destes flocos de pequenas dimensões e elevado conteúdo orgânico no efluente final; *bulking* filamentoso pela proliferação de bactérias filamentosas e com dificuldade de sedimentação dos flocos que se encontram ligados entre si por intermédio das bactérias filamentosas; crescimento disperso pela presença de poucas bactérias formadoras de flocos, apresentando elevada turbidez e conteúdo orgânico no efluente final; e *bulking* zoogeal pela presença de grandes flocos com baixa capacidade de sedimentação e compactação.

A observação microscópica torna-se assim um método de extrema importância para monitorizar e controlar os sistemas de lamas activadas e, como reflexo, as técnicas microscópicas têm vindo a ser utilizadas para caracterizar os agregados microbianos de lamas activadas (Andreadakis, 1993; Barbusinski e Koscielniak, 1995). Mais, a associação de técnicas de processamento e análise de imagem à visualização microscópica tem permitido uma avaliação mais expedita das propriedades das lamas activadas (Li e Ganczarczyk, 1991; Grijspeerdt e Verstraete, 1997). Actualmente, vários autores têm desenvolvido metodologias de processamento e análise de imagem para caracterização da biomassa do sistema, dos quais se destacam da Motta *et al.* (2001, 2002), Cenens *et al.* (2002), Amaral (2003), Amaral e Ferreira (2005), Jenné *et al.* (2006) e Arelli *et al.* (2009). Assim, a relação entre as propriedades de sedimentabilidade e as características da biomassa agregada e filamentosa tem vindo a ser estudada, tendo já sido estabelecidas correlações entre o índice volumétrico de lamas (IVL) e as propriedades morfológicas das lamas, principalmente em situações de *bulking* filamentoso (da Motta *et al.*, 2002; Amaral e Ferreira, 2005).

Este trabalho tem por objectivo a identificação e quantificação de agregados microbianos e de bactérias filamentosas, provenientes de uma instalação laboratorial de lamas activadas, através de uma metodologia de processamento e análise de imagem. Pretende-se, assim, estudar a capacidade desta tecnologia em detectar diferentes condições de funcionamento das lamas activadas (operação normal, flocos *pin point*, *bulking* filamentoso e *bulking* zoogeal) que podem afectar a sedimentabilidade das lamas, e também correlacionar os parâmetros operacionais com os parâmetros morfológicos obtidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição da instalação laboratorial

Os dados experimentais deste trabalho foram obtidos através de um sistema laboratorial de lamas activadas composto por um tanque de arejamento com 17 L de biomassa em suspensão, seguido por um sedimentador cilíndrico com 2.5 L de capacidade. O tanque de arejamento foi inoculado com lamas activadas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais domésticas localizada em Braga. A alimentação sintética (Quadro 1) fornecida ao sistema foi preparada em laboratório usando acetato como principal fonte de carbono. Uma solução de micronutrientes foi também adicionada à alimentação de forma a permitir a manutenção da biomassa. Durante este estudo, e dependendo das perturbações pretendidas (*bulking* filamentoso, flocos *pin point*, *bulking* zoogléico e condições normais), foi alterada a razão alimentação/microrganismos (F/M). No início de cada experiência foi também necessário re-inocular o sistema para mais rapidamente se atingirem as novas condições pretendidas.

Quadro 1. Composição da alimentação sintética utilizada neste estudo.

Componente	Concentração (mg/L)
NaCH ₃ COO.3H ₂ O	2073
(NH ₄) ₂ SO ₄	140
MgSO ₄ .7H ₂ O	25
KH ₂ PO ₄	44
K ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	59
CaCl ₂ .2H ₂ O	30
FeCl ₃ .6H ₂ O	18.8
NaHCO ₃	105

Durante a operação do sistema, o pH foi controlado por um medidor de pH associado a uma bomba de controlo (Modelo BL 7916-BL 7917, *Hanna Instruments*, Woonsocket, RI, USA). A mistura completa dentro do tanque de arejamento foi garantida pelo fornecimento de um fluxo contínuo de bolhas de ar através de um difusor de ar colocado na parte inferior do tanque de arejamento. De forma a manter a concentração de oxigénio a 7 mg L⁻¹, foi usada uma sonda de oxigénio (TriOmatic 690, *WTW*, Weilheim, Germany). Finalmente, a recirculação de lamas do sedimentador para o tanque de arejamento foi garantida através de uma bomba de ar. Na Figura 1 observa-se um esquema que representa o sistema de lamas activadas usado para este estudo.

2.2 Determinação dos parâmetros operacionais

A obtenção das diferentes condições de *bulking* filamentoso, de formação de flocos *pin point*, de *bulking* zoogléico e de condições normais foram realizadas sequencialmente por esta ordem. A biomassa presente no início de cada uma das experiências pretendidas não

transitou da experiência anterior, tendo sido reinoculado o sistema entre as experiências de *bulking* filamentoso, de formação de flocos *pin point*, de *bulking* zooglear e de condições normais, para mais rapidamente se atingirem as novas condições pretendidas. Foram recolhidas amostras no decurso de cada experiência e determinados parâmetros operacionais tais como os sólidos suspensos totais (SST) e o índice volumétrico de lamas (IVL). Os SST foram determinados usando os procedimentos existentes no *Standard Methods* (APHA *et al.*, 1989). Este valor foi posteriormente usado para calcular o IVL, determinado por sedimentação da biomassa em suspensão num cone *Imhoff* de 1 L durante 30 minutos. Este parâmetro de sedimentabilidade da biomassa é determinado através da seguinte equação:

$$\frac{H_{30}}{H_0 \times SST} \quad (1)$$

Em que:

H_0 – Altura da biomassa no tempo 0 minutos

H_{30} - Altura da biomassa no tempo 30 minutos

SST – Sólidos suspensos totais

2.3 Aquisição e processamento das imagens

A visualização da comunidade microbiana foi efectuada recorrendo a um microscópio óptico Olympus BX51 (*Olympus*, Tokyo, Japan) e a uma câmara fotográfica Olympus DP25 (*Olympus*, Tokyo, Japan). As imagens foram visualizadas em campo claro a uma ampliação total de 100 vezes e adquiridas a uma escala de cinzentos de 8 bits e resolução de 1360×1024 pixéis, por intermédio do *software* de aquisição Cell^B (*Olympus*, Tokyo, Japan). Na Figura 1 é possível observar esquematicamente o método de aquisição de imagens.

As amostras para visualização e aquisição foram retiradas do tanque de arejamento e a aquisição de imagem foi sempre efectuada em triplicado (usando 3 lâminas) recorrendo a uma micropipeta com uma ponta seccionada para garantir a passagem dos agregados maiores. Em cada triplicado 10 μ L de amostra foram colocados numa lâmina e cobertos com uma lamela de 20 mm \times 20 mm para posterior observação ao microscópio. Em cada lâmina foram adquiridas 50 fotografias (na parte superior, intermédia e inferior) de modo a obter informação representativa da comunidade microbiana existente no sistema.

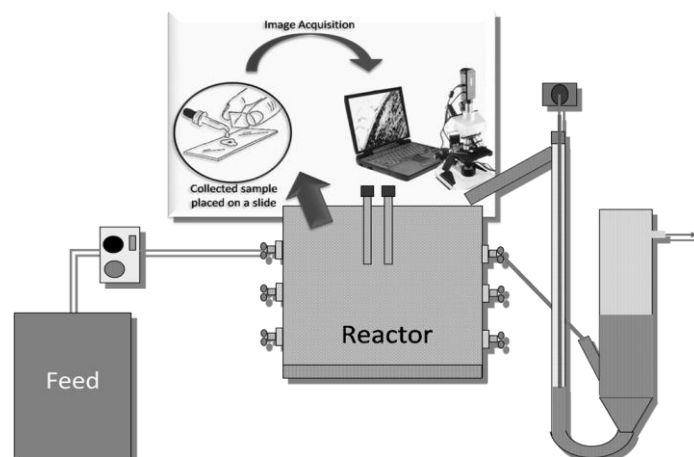


Figura 1. Esquema da instalação laboratorial e procedimento para aquisição de imagem.

O programa de processamento e análise de imagem utilizado neste trabalho foi desenvolvido em Matlab 7.3 (*The Mathworks, Inc., Natick, USA*), adaptado de uma versão previamente desenvolvida por Amaral (2003). A principal etapa do processamento baseia-se na binarização das imagens referentes aos agregados e bactérias filamentosas através de processos de segmentação e eliminação de detritos (Figura 2). A etapa seguinte destina-se à caracterização dos agregados microbianos e das bactérias filamentosas.

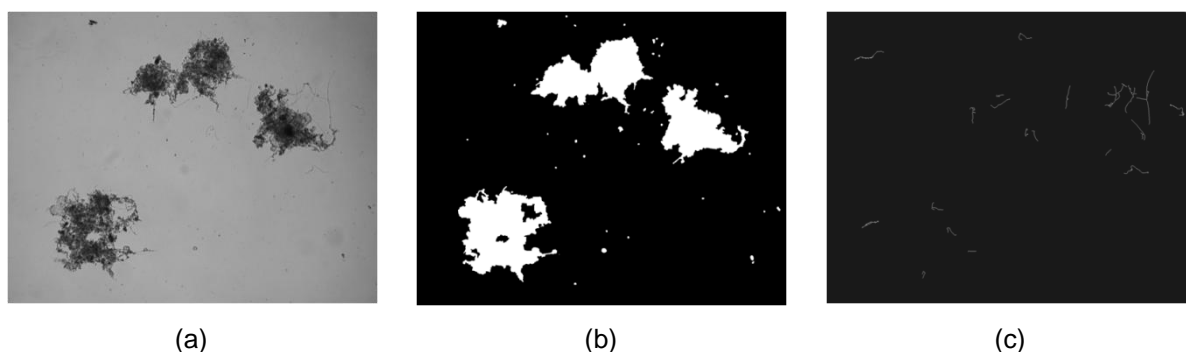


Figura 2. (a) Imagem original, (b) imagem binária dos agregados, (c) imagem binária dos filamentos.

2.4 Determinação dos parâmetros morfológicos

A caracterização dos agregados foi efectuada através da divisão dos mesmos em 3 classes tendo por base o diâmetro equivalente: microflocos (diâmetro equivalente inferior a 25 μm), mesoflocos (diâmetro equivalente entre 25 e 250 μm) e macroflocos (diâmetro equivalente superior a 250 μm). Neste estudo, para cada uma das classes estabelecidas determinou-se a área percentual (Area %) de cada classe de agregados. O conteúdo em biomassa agregada (TA/Vol) foi calculado através da soma das áreas dos agregados reconhecidos pelo programa e o conteúdo em biomassa filamentosa (TL/Vol) foi determinado através do comprimento total de filamentos em cada amostra. Finalmente, foi determinada a razão

entre o conteúdo de bactérias filamentosas (através do comprimento total de filamentos) e os sólidos suspensos totais, (TL/TSS), bem como a razão entre o conteúdo de bactérias filamentosas e o conteúdo de biomassa agregada, através do logaritmo entre o comprimento total de filamentos e a área total de agregados ($\ln(TL/TA)$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Índice volumétrico de lamas e sólidos suspensos totais

Como referido anteriormente, a obtenção das diferentes condições de *bulking* filamentoso, de formação de flocos *pin point*, de *bulking* zoogleal e de condições normais foram realizadas sequencialmente. Deste modo, o primeiro passo da análise dos resultados obtidos foi o de identificar o período em que, verdadeiramente estas diferentes condições foram estabelecidas. Para o efeito foram avaliados os valores do índice volumétrico de lamas (IVL), para o estabelecimento das condições de *bulking* e dos sólidos suspensos totais (SST), principalmente para a obtenção de flocos *pin point* não sedimentáveis.

A evolução do índice volumétrico de lamas no decurso das várias experiências, representada na Figura 1, permitiu determinar a formação de condições de *bulking* nas experiências de *bulking* filamentoso e zoogleal, sendo considerado que um valor de IVL superior a 150 mL/g corresponde a *bulking*, ao contrário das experiências de formação de condições normais e de flocos *pin point*. Enquanto no decurso das experiências laboratoriais para obtenção de condições normais (CN), *bulking* filamentoso (BF1) e flocos *pin point* (PP), as mesmas foram obtidas logo após o início das mesmas, tal não aconteceu na experiência laboratorial para a obtenção de condições de *bulking* zoogleal (BZ). De facto, após a experiência dos flocos *pin point*, existiu um período transição até se obterem as condições de *bulking* zoogleal, que foi denominado de período de transição 1 (TR1). Durante este período o IVL manteve-se normalmente abaixo de 150 mL/g e os SST evidenciaram uma descida, factos que não se coadunam com a condição de *bulking* zoogleal. Para o final da experiência de *bulking* zoogleal notou-se uma perturbação no reactor que resultou numa primeira instância na obtenção de um segundo período de transição (TR2) e numa segunda instância na obtenção de novas condições de *bulking* filamentoso (BF2). Durante o período de transição 2, verificou-se que, embora o valor de SST se mantivesse inicialmente elevado, os valores do IVL durante todo este período foram inferiores a 150 mL/g. Em relação ao período de obtenção de condições de *bulking* após TR2, estas foram identificadas como sendo *bulking* filamentoso (BF2) devido ao facto de, para além de se registar um valor de IVL superior a 150 mL/g, ter sido notória a presença de elevadas concentrações de bactérias filamentosas (posteriormente identificadas como *Thiothrix* e *Tipo 021N* por inspecção visual e colorações FISH), por intermédio de uma monitorização microscópica da biomassa. Mais, o cruzamento destes dados com os obtidos por análise de imagem, referidos seguidamente, confirmou este facto.

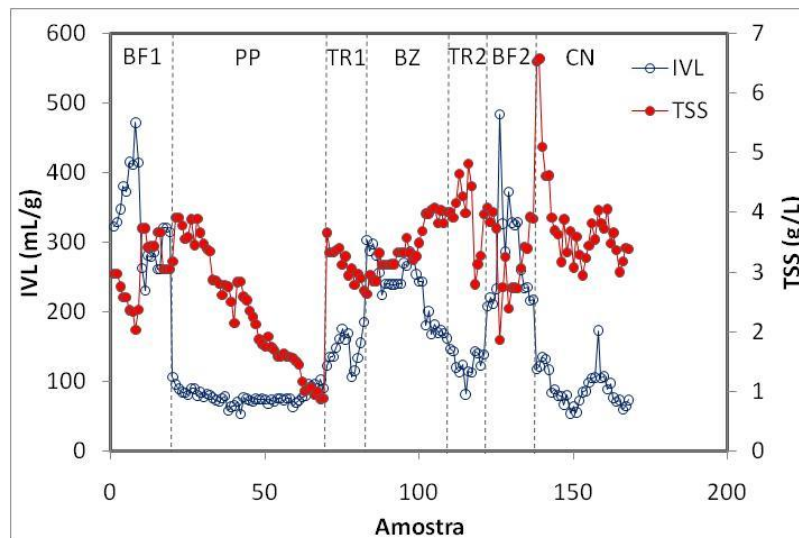


Figura 1. Evolução experimental do IVL e dos SST. (BF – *Bulking* filamentoso; PP – Flocos *pin point*; TR – Período de transição; BZ – *Bulking* zooglear; CN – condições normais)

Na figura 2 encontram-se representados os valores de IVL para as amostras reconhecidas como pertencendo às quatro condições estudadas. No tocante às condições de *bulking* filamentoso, as amostras até à amostra 20 reportam-se ao primeiro período de *bulking* filamentoso no início da realização das experiências (BF1), ao passo que as amostras seguintes se referem ao novo período de obtenção de *bulking* filamentoso (BF2), no decurso da perturbação no reactor. À excepção da última amostra do período de BF1, todas as outras amostras alocadas a *bulking* filamentoso ou a *bulking* zooglear evidenciaram possuir um IVL superior a 150 mL/g, indicador da existência de uma situação de *bulking*. Verificou-se ainda que, neste trabalho, as condições de *bulking* filamentoso permitiram atingir maiores valores de IVL, até perto de 500 mL/g, do que as condições de *bulking* zooglear (até um valor de aproximadamente 300 mL/g). Em relação às amostras alocadas a condições que não originam situações de *bulking*, como condições normais e produção de flocos *pin point*, verificou-se que, à excepção de uma amostra pertencente às condições normais, os valores de IVL se mantiveram abaixo do valor limite de 150 mL/g. Relembre-se que os flocos *pin point*, por praticamente não serem sedimentáveis, não influenciam negativamente o IVL, determinado a partir da parte sedimentável da biomassa.

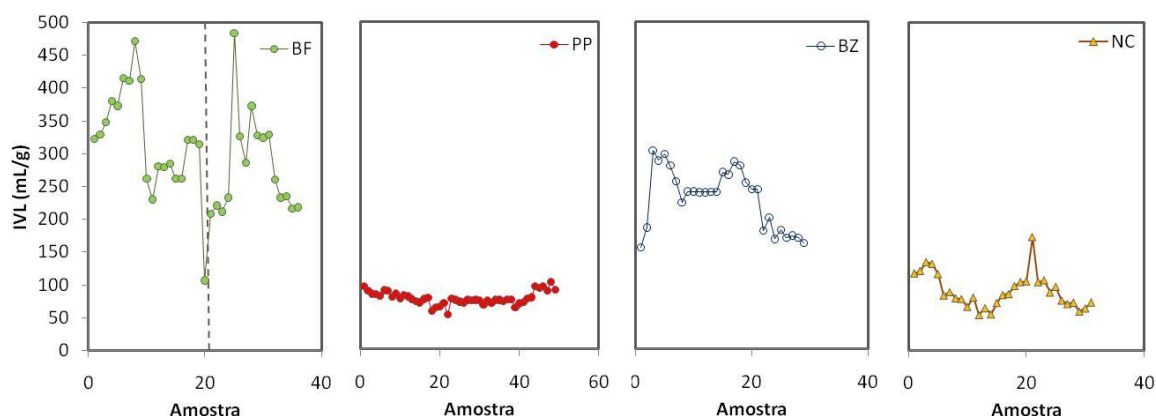


Figura 2. Evolução experimental do IVL para cada condição identificada. (BF – *Bulking* filamentoso; PP – Flocos *pin point*; BZ – *Bulking* zooglear; CN – condições normais)

Na figura 3 encontram-se representados os valores dos SST para as amostras reconhecidas como pertencendo às quatro condições estudadas. Mais uma vez, no tocante às condições de *bulking* filamentoso, as amostras até à amostra 20 reportam-se ao primeiro período de *bulking* filamentoso no início da realização das experiências (BF1), ao passo que as amostras seguintes se referem ao novo período de obtenção de *bulking* filamentoso (BF2), no decurso da perturbação no reactor. A evolução dos SST para a experiência de formação dos flocos *pin point* permitiu evidenciar uma gradual descida dos sólidos suspensos, de acordo com o fenómeno de lavagem da biomassa agregada previsível para este tipo de condições, que implica a formação de agregados não sedimentáveis e mecanicamente frágeis. O oposto pode ser observado para a experiência de obtenção de condições de *bulking* zooglear, com um aumento dos sólidos suspensos no decurso da mesma, concordante com o aumento da biomassa agregada expectável para este tipo de condições. De referir ainda que, embora a biomassa agregada possua uma sedimentabilidade inferior aos flocos obtidos em condições de operação normais, implicando um aumento do tempo necessário para a sua sedimentabilidade e um aumento do IVL, estes eventualmente sedimentam ao contrário dos flocos *pin point*, este facto faz com que este tipo de biomassa não esteja sujeito às mesmas condições de lavagem que os flocos *pin point*. Em relação às experiências de obtenção de condições de *bulking* filamentoso e de flocos normais, observou-se uma oscilação dos sólidos suspensos em ambos os casos, sendo de referir que, no início da experiência de condições normais, se verificou uma clara diminuição dos sólidos suspensos em virtude de se ter partido de condições de SST muito elevadas. Este facto deveu-se à elevada concentração da biomassa presente no inóculo introduzido no início desta experiência.

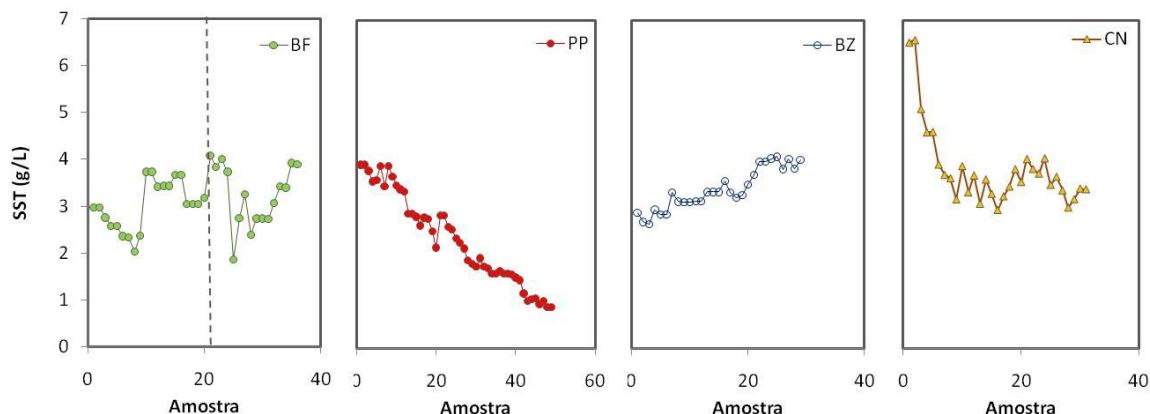


Figura 3. Evolução experimental dos SST para cada condição identificada. (BF – *Bulking* filamentoso; PP – Flocos *pin point*; BZ – *Bulking* zooglear; CN – condições normais)

3.2 Parâmetros morfológicos da biomassa

Através da utilização de técnicas de processamento e análise de imagens foi possível determinar a estrutura da biomassa no tocante à sua composição em biomassa agregada e filamentosa. A percentagem de biomassa agregada em microflocos (diâmetro equivalente inferior a 25 μm), mesoflocos (diâmetro equivalente entre 25 e 250 μm) e macroflocos (diâmetro equivalente superior a 250 μm) encontra-se representada na figura 4. Analisando os períodos equivalentes a *bulking* filamentoso (BF1 e BF2), estes destacaram-se dos restantes períodos pelo facto de a percentagem de microflocos suplantarem, quase sempre, a de mesoflocos. Este facto reflecte a estrutura da biomassa agregada em *bulking* filamentoso com um elevado conteúdo em microflocos, quer sob a forma de agregados dispersos no licor misto, quer também de um modo significativo ligados a bactérias filamentosas. Por oposição, os microflocos que compõem os flocos *pin point* não se encontraram significativamente ligados a biomassa filamentosa, encontrando-se, quase exclusivamente, dispersos no licor misto. Ainda durante a experiência de obtenção de flocos *pin point* verificou-se que a percentagem de microflocos não foi tão elevada quanto seria expectável, encontrando-se, inclusivamente, abaixo da percentagem de mesoflocos. Este facto indicou que, durante a experiência de obtenção de flocos *pin point*, não foram obtidos agregados de diminutas dimensões em tão elevada quantidade quanto o desejável. De facto, não existiu uma diferença tão notória quanto se esperaria, no tocante à relação entre microflocos e mesoflocos, relativamente aos flocos formados em condições normais e mesmo em condições de *bulking* zooglear. Contudo, lembrando a lavagem sofrida pela biomassa, evidenciada pela análise dos sólidos suspensos, pode-se concluir que os agregados formados durante esta experiência revelaram-se praticamente não sedimentáveis e facilmente removidos do reactor, em oposição aos flocos formados em condições normais e de *bulking* zooglear. Mais, a análise da estrutura da biomassa formada em condições de *bulking* zooglear permitiu evidenciar uma maior composição (percentagem) da mesma em macroflocos, que as restantes condições. Tal facto seria expectável uma vez que estas condições implicam a formação de agregados de maiores dimensões devido, essencialmente, à sobreprodução de exopolímeros. Analisando a estrutura da biomassa no

período de condições normais, esta revelou um predomínio de mesoflocos em relação aos microflocos e valores residuais de macroflocos.

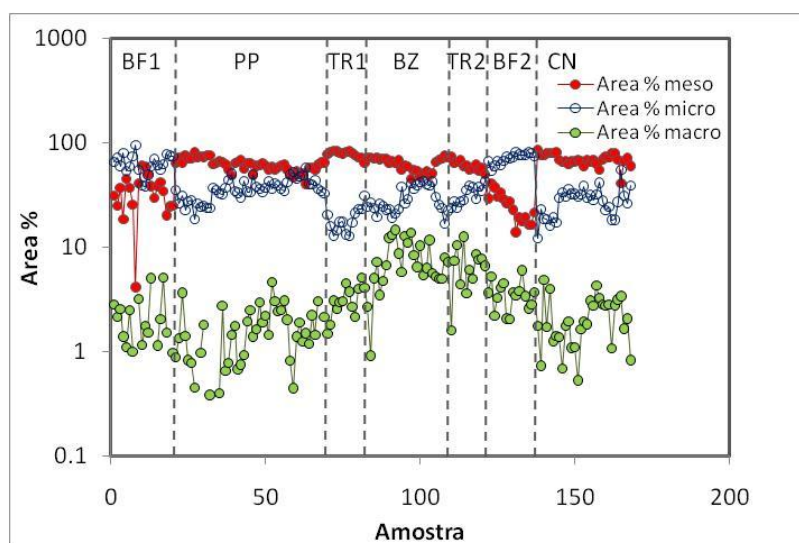


Figura 4. Evolução experimental da percentagem de área de microflocos, mesoflocos e macroflocos. (BF – *Bulking* filamentoso; PP – Flocos *pin point*; TR – Período de transição; BZ – *Bulking* zoogléico; CN – condições normais)

O conteúdo da biomassa em agregados bacterianos (TA/Vol) e bactérias filamentosas (TL/Vol), a relação entre ambos ($\ln(TL/TA)$) e a relação entre bactérias filamentosas e os sólidos suspensos (TL/TSS) foram também alvos de estudo deste trabalho, encontrando-se representados na figura 5. Saliente-se que o parâmetro $\ln(TL/TA)$ foi utilizado com o intuito de se verificar se este pode ser entendido como um eficaz substituto do parâmetro TL/TSS, uma vez que o factor de correlação R obtido entre os dois foi de 0.968, e o parâmetro $\ln(TL/TA)$ apresenta a vantagem de não depender da determinação dos sólidos suspensos totais. Analisando os resultados obtidos verificou-se que o conteúdo em bactérias filamentosas (TL/Vol) foi superior quando em condições de *bulking* filamentoso, assim como as relações entre bactérias filamentosas e agregados ($\ln(TL/TA)$) e entre bactérias filamentosas e os sólidos suspensos (TL/TSS). De facto, estes parâmetros apresentaram os seus maiores valores para este tipo de condições, o que seria expectável devido ao crescimento das bactérias filamentosas durante estes períodos. Este facto vem reforçar a identificação do período de *bulking* referido como BF2 como sendo, de facto, de origem filamentosa. Durante o período de *bulking* zoogléico, foi notório o crescimento do conteúdo em biomassa agregada (TA/Vol), em concordância com o crescimento evidenciado pelos TSS referido anteriormente. Por outro lado, o conteúdo em bactérias filamentosas (TL/Vol) apresentou uma tendência decrescente com o decorrer deste período, tal como a relação entre a biomassa filamentosa com os sólidos suspensos (TL/TSS), e com a biomassa agregada ($\ln(TL/TA)$). Estes factos seriam expectáveis, uma vez que as condições associadas ao *bulking* zoogléico potenciam o crescimento da biomassa agregada por oposição à biomassa filamentosa. Em relação ao período de formação de flocos *pin point*

verificou-se uma diminuição do conteúdo em biomassa agregada (TA/Vol), concordante com a diminuição evidenciada pelos TSS, o que configura uma lavagem da biomassa. Apesar do conteúdo em biomassa filamentosa (TL/Vol) se manter baixo e aproximadamente constante durante este período, a sua relação com os sólidos suspensos (TL/TSS), e com a biomassa agregada ($\ln(TL/TA)$), sofreu um crescimento contínuo ao longo do período. Tal facto é explicável pela elevada lavagem da biomassa agregada referido anteriormente. Analisando a estrutura da biomassa no período de condições normais, esta revelou um conteúdo em bactérias filamentosas baixo, assim como a sua relação com os sólidos suspensos (TL/TSS), e com a biomassa agregada ($\ln(TL/TA)$).

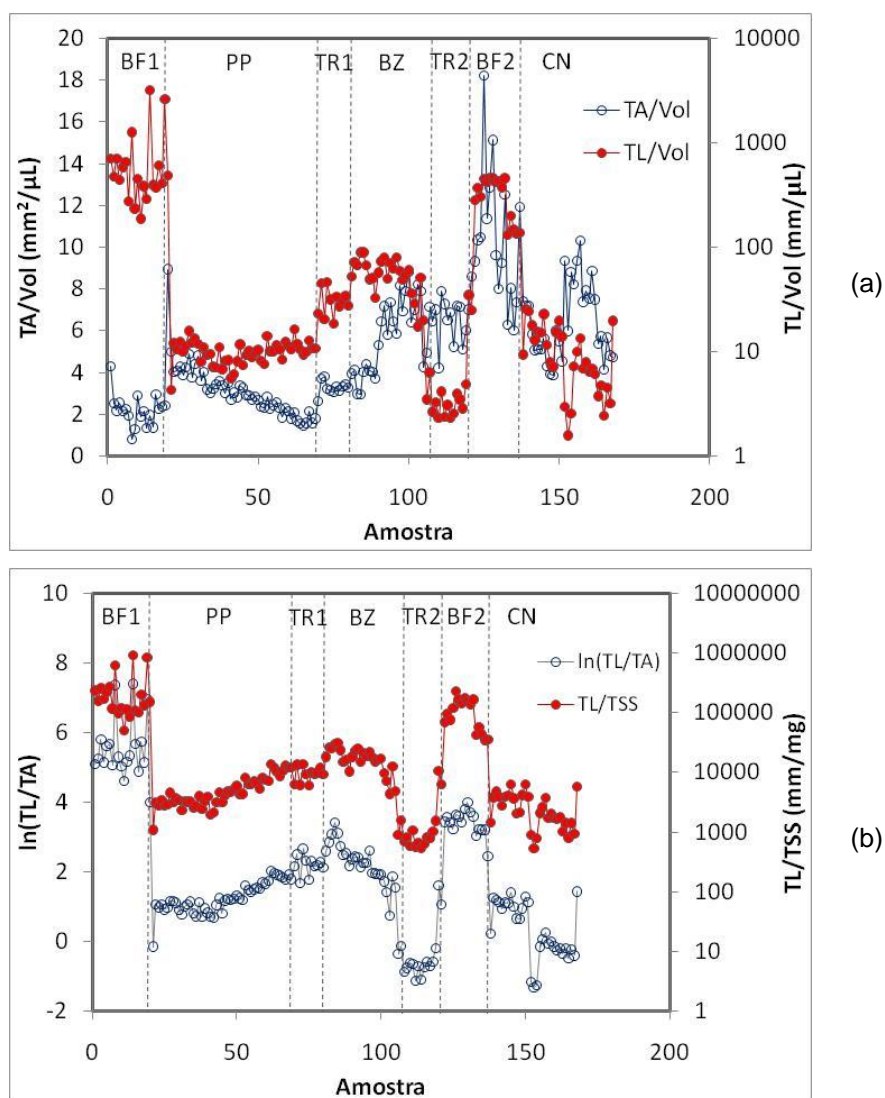


Figura 5. Evolução experimental do (a) conteúdo em biomassa agregada (TA/Vol) e filamentosa (TL/Vol) e (b) do TL/TSS e do $\ln(TL/TA)$. (BF – *Bulking* filamentoso; PP – Flocos *pin point*; TR – Período de transição; BZ – *Bulking* zoogeal; CN – condições normais)

3.3 Correlações para a aferição do IVL

Os parâmetros obtidos com recurso ao processamento e análise de imagens permitiram ainda a aferição do índice volumétrico de lamas, para além do esclarecimento das inter-relações entre este e a composição da biomassa. Deste modo, foram estudadas as correlações entre o IVL e o conteúdo em bactérias filamentosas (TL/Vol), a relação do conteúdo em filamentosas com os sólidos suspensos (TL/TSS), e a relação do conteúdo em filamentosas com a biomassa agregada (ln(TL/TA)), apresentadas na figura 6.

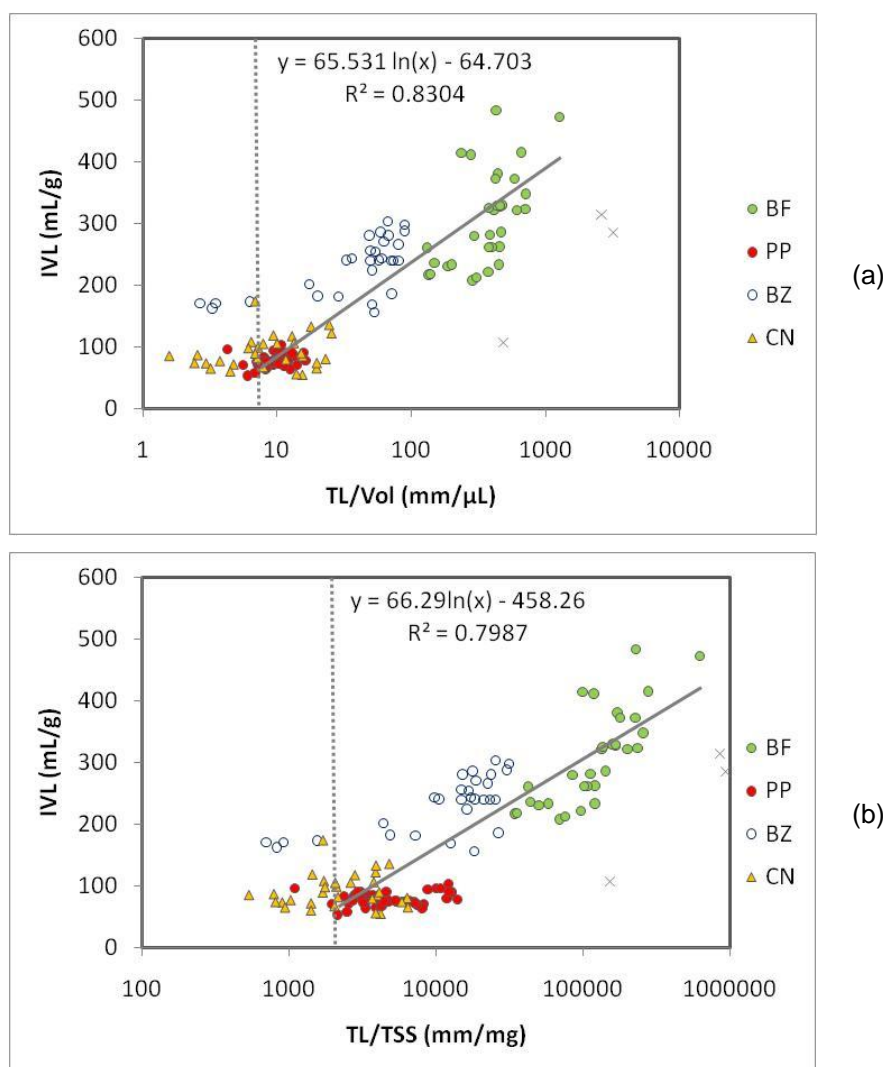


Figura 6. Correlações entre IVL e (a) conteúdo em filamentosas, (b) TL/TSS. Os pontos em cruz foram eliminados para a obtenção da correlação. (BF – *Bulking* filamentoso; PP – Flocos *pin point*; BZ – *Bulking* zoogeal; CN – condições normais)

Na figura 6a pode-se observar uma dependência directa entre o IVL e o conteúdo em biomassa filamentosa (factor de correlação R de 0.911), para o total das experiências e para

TL/Vol acima de 7 mm/ μ L. No decurso do estudo desta dependência verificou-se que a mesma apenas se torna evidente a partir do valor limite mínimo de TL/Vol de 7 mm/ μ L, abaixo do qual a quantidade de bactérias filamentosas presente parece não influir directamente para o IVL apresentado. Analisando a figura 6a, verifica-se que a correlação encontrada se encontra fortemente dependente das amostras representativas das condições de *bulking* filamentoso e de *bulking* zoogléa, uma vez que estas duas condições propiciam os valores de conteúdo em filamentosas e de IVL que se estendem pela maior gama de dependência directa. O mesmo tipo de análise foi efectuado para a correlação entre o IVL e a relação do conteúdo em filamentosas com os sólidos suspensos (TL/TSS), largamente utilizado em estudos anteriores (Amaral *et al.*, 2003, Amaral e Ferreira, 2005, Lee *et al.*, 1983; Matsui e Yamamoto, 1984). Mais uma vez se verificou uma dependência directa (factor de correlação R de 0.894), para o total das experiências e para TL/TSS acima de 2000 mm/mg. Do mesmo modo que anteriormente, abaixo do valor limite de TL/TSS de 2000 mm/mg, a relação entre o conteúdo em filamentosas e os sólidos suspensos parece não influir directamente para o IVL apresentado. Mais uma vez, analisando a figura 6b, verifica-se que a correlação encontrada se encontra fortemente dependente das amostras representativas das condições de *bulking* filamentoso e de *bulking* zoogléa, uma vez que estas duas condições propiciam os valores de TL/TSS e de IVL que se estendem pela maior gama de dependência directa. Apesar de, nos estudos referidos, se ter provado a validade da utilização do parâmetro TL/TSS como o melhor parâmetro para a aferição do IVL em condições de *bulking* filamentoso, os resultados obtidos neste trabalho para um maior conjunto de condições parecem apontar para uma maior adequabilidade do parâmetro TL/Vol nestas condições. Em relação ao uso do parâmetro $\ln(TL/TA)$ em substituição de TL/TSS, este não se verificou tão eficaz de aferir o valor de IVL, tendo apresentado um valor de factor de correlação R de apenas 0.860.

3.4 Correlações para a aferição dos SST

No decurso deste trabalho foi ainda procurado esclarecer a dependência dos sólidos suspensos totais com os parâmetros obtidos pela técnica de processamento e análise de imagens, como representado na Figura 7.

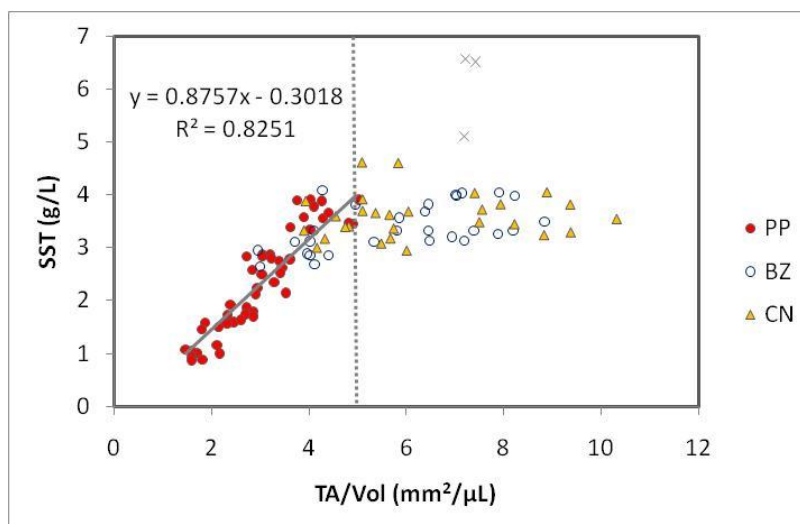


Figura 7. Correlação entre SST e conteúdo em agregados. Os pontos em cruz foram eliminados para a obtenção da correlação. (BF – *Bulking* filamentoso; PP – Flocos *pin point*; BZ – *Bulking* zoogleal; CN – condições normais)

Após a análise das variadas inter-relações determinou-se que os SST apenas se revelaram directamente dependentes (R de 0.908) do conteúdo em agregados até ao valor de TA/Vol de $5 \text{ mm}^2/\mu\text{L}$, e excluindo as amostras da condição de *bulking* filamentoso. Verificou-se assim que apenas para condições muito específicas é possível aferir o valor dos sólidos suspensos totais a partir de TA/Vol, respeitantes aos casos em que o conteúdo em biomassa filamentosa não seja muito elevado. Deste modo, em todas as condições de *bulking* filamentoso ou em condições normais ou de *bulking* zoogleal com elevado conteúdo de bactérias filamentosas essa aferição deixa de ser possível. Pelo contrário, para condições de formação de flocos *pin point* e para condições normais ou de *bulking* zoogleal com baixo conteúdo de bactérias filamentosas o conteúdo em biomassa agregada pode ser utilizado para aferir os sólidos suspensos.

4 CONCLUSÕES

No decurso deste trabalho pôde-se concluir que os parâmetros obtidos por análise de imagem permitiram o esclarecimento das diferentes inter-relações e da possibilidade de aferição de dois dos mais importantes parâmetros operacionais (IVL e SST) com a composição da biomassa, para cada condição estudada.

A análise das inter-relações para a experiência de *bulking* filamentoso permitiu evidenciar o elevado conteúdo da biomassa agregada em microflocos quer sob a forma de agregados dispersos no licor misto, quer ligados a bactérias filamentosas, suplantando, quase sempre, o conteúdo em mesoflocos. Verificou-se ainda o mais elevado conteúdo em bactérias filamentosas, assim como os maiores valores da relação da biomassa filamentosa com a biomassa agregada e com os sólidos suspensos. Relativamente à experiência de formação de flocos *pin point*, apesar de não se verificar um predomínio dos microflocos em relação aos mesoflocos, estes não se encontraram significativamente ligados a biomassa filamentosa (quase inexistente como comprovado pelo baixo conteúdo em biomassa filamentosa). Foi ainda possível verificar um fenómeno de lavagem da biomassa pela diminuição do conteúdo em biomassa agregada, concordante com a evolução dos sólidos suspensos que provocou ainda um incremento da relação da biomassa filamentosa com a biomassa agregada e com os sólidos suspensos. Mais, pôde-se ainda concluir que os agregados formados durante esta experiência se revelaram praticamente não sedimentáveis e facilmente removidos do reactor, em oposição aos flocos formados em condições normais e de *bulking* zoogleal. No tocante à experiência de *bulking* zoogleal foi notória uma maior composição da biomassa em macroflocos, que nas restantes condições, assim como o crescimento do conteúdo em biomassa agregada, em concordância com o crescimento evidenciado pelos sólidos suspensos. O conteúdo em bactérias filamentosas apresentou uma tendência decrescente com o decorrer deste período, tal como a relação entre a biomassa filamentosa com os sólidos suspensos e com a biomassa agregada, uma vez que

as condições associadas ao *bulking* zoogleal potenciam o crescimento da biomassa agregada por oposição à biomassa filamentosa. Analisando a estrutura da biomassa no período de condições normais, esta revelou um predomínio de mesoflocos em relação aos microflocos e valores residuais de macroflocos, assim como um conteúdo em bactérias filamentosas baixo, tal como a relação da biomassa filamentosa com a biomassa agregada e com os sólidos suspensos.

O estudo da possibilidade de aferição do IVL com a composição da biomassa, revelou uma maior adequabilidade do conteúdo em biomassa filamentosa acima de 7 mm/ μ L, no conjunto das condições estudadas para prever o valor de IVL, do que a relação entre a biomassa filamentosa com os sólidos suspensos, utilizada em estudos anteriores para condições exclusivas de *bulking* filamentoso. No tocante à aferição dos SST, verificou-se que apenas para condições de formação de flocos *pin point* e para condições normais ou de *bulking* zoogleal com baixo conteúdo de bactérias filamentosas, inferior a 5 mm²/ μ L, o conteúdo em biomassa agregada pode ser utilizado para aferir os sólidos suspensos

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar o seu agradecimento à Fundação para a Ciência e a Tecnologia pela bolsa de doutoramento SFRH/BD/32329/2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral, A.L. (2003) *Image Analysis in Biotechnological Processes: Applications to Wastewater Treatment*. Tese de Doutoramento, Universidade do Minho (<http://hdl.handle.net/1822/4506>).

Amaral, A.L., Ferreira, E.C. (2005) Activated sludge monitoring of a wastewater treatment plant using image analysis and partial least squares regression. *Analytica Chimica Acta* **544**, 246-253.

Andreadakis, A. (1993) Physical and chemical properties of activated sludge flocs. *Water Research* **12**, 1707-1714.

APHA, AWWA, WPCF. (1989) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 17th Ed., American Public Health Association, Washington D.C.

Arelli, A., Luccarini, L., Madoni, P. (2009) Application of image analysis in activated sludge to evaluate correlations between settleability and features of flocs and filamentous species. *Water Science and Technology* **59** (10), 2029-2036.

Barbusinski, K., Koscielniak, H. (1995) Influence of substrate loading intensity on floc size in activated sludge process. *Water Research* **29** (7), 1703-1710.

Bitton G. (1994) *Wastewater Microbiology*, Wiley-Liss Pub., New York.

Cenens, C, Van Beurden, K.P., Jenné, R., Van Impe, J.F. (2002) On the development of a novel image analysis technique to distinguish between flocs and filaments in activated sludge images. *Water Science and Technology* **46**(1-2), 381-387.

- da Motta, M., Pons, M.N., Roche, N., Vivier, H. (2001) Characterization of activated sludge by automated image analysis. *Biochemical Engineering Journal* **9**, 165-173.
- da Motta, M., Pons, M.N., Roche, N. (2002) Study of filamentous bacteria by image analysis and relation with settleability. *Water Science and Technology* **46** (1-2), 363-369.
- Grijpspeerdt, K., Verstraete, W. (1997) Image analysis to estimate the settleability and concentration of activated sludge. *Water Research* **31** (5), 1126-1134.
- Jenkins, D., Richard, M.G., Daigger, G. (2003) Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming and other solids separation problems. Lewis publishing, Boca Raton, FL.
- Jenné, R., Banadda, E.N., Gins, G., Deurinck, J., Smets, I.Y., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. (2006) Use of image analysis for sludge characterisation: studying the relation between floc shape and sludge settleability. *Water Science and Technology* **54**(1), 167-174.
- Lee, S.E., Koopman, B., Bode, H., Jenkins, D. (1983) Evaluation of alternative sludge settleability indexes. *Water Research* **17** (10), 1421-1426.
- Li, D., Ganczarczyk, J. (1991) Size distribution of activated sludge flocs. *Journal of Water Pollution Control Federation* **63**, 806-814.
- Matsui, S., Yamamoto, R. (1984) The use of color TV technique for measuring filament length and investigating sludge bulking causes. *Water Science and Technology* **16** (10-1), 69-81.
- Wilén, B.M., Balmer, P. (1999) The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Water Research* **33** (2), 391-400.